

Ю. В. Петричук – завідувач лабораторії екологічного моніторингу Національного природного парку «Гуцульщина»;
М. В. Пасайлюк – старший науковий співробітник наукового відділу Національного природного парку «Гуцульщина»;
М. М. Сухомлин – доктор біологічних наук, професор кафедри ботаніки ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Гриби Червоної книги України в культурі. 1. Закономірності росту *Hericium coralloides*

Роботу виконано у НПП «Гуцульщина»,
ННЦ «Інститут біології» КНУ ім. Т. Шевченка

На території НПП «Гуцульщина» виявлено лише три локалітети *Hericium coralloides* – гриба, занесеного до Червоної книги України. У результаті проведених досліджень виділено в чисту культуру аборигенний штам K01. Як для виділення, так і для підтримки та забезпечення життєздатності гриба в культурі картопельно-глюкозний агар виявився оптимальним серед апробованих середовищ. Індивідуальні особливості росту *H. coralloides* K01 вказують на вузькі трофічні можливості цього штаму при поверхневому культивуванні, оскільки з п'яти апробованих середовищ придатними для росту виявилися лише два. Цей штам гриба вважаємо перспективним для використання як інокулянта відповідних субстратів у природному середовищі, оскільки для нього характерні високі показники радіального росту, короткий період log-фази та утворення в чистій культурі стадії телеоморфи.

Ключові слова: *Hericium coralloides*, мицеліальні культури, швидкість радіального росту.

Петричук Ю. В., Пасайлюк М. В., Сухомлин М. Н. Грибы Красной книги Украины в культуре. 1. Закономерности роста *Hericium coralloides*. На территории НПП «Гуцульщина» выявлено только три локалитета *Hericium coralloides* – гриба, занесенного в Красную книгу Украины. Результатом проведенных исследований стало выделение в чистую культуру аборигенного штамма K01. Как для выделения, так и для поддержки и обеспечения жизнеспособности гриба в культуре картофельно-глюкозный агар оказался оптимальным среди апробированных сред. Индивидуальные особенности роста *H. coralloides* K01 указывают на узкие трофические возможности этого штамма при поверхностном культивировании, поскольку из пяти апробированных сред пригодными для роста оказались только две. Данный штамм гриба считаем перспективным для использования в качестве инокулянта соответствующих субстратов в среде, поскольку для него характерны высокие показатели радиального роста, короткий период log-фазы и образования в чистой культуре стадии телеоморфы.

Ключевые слова: *Hericium coralloides*, мицелиальные культуры, скорость радиального роста.

Petrychuk Yu. V., Pasaylyuk M. V., Sukhomlyn M. M. Mushrooms Red Book of Ukraine in Culture. 1. Patterns of Growth *Hericium coralloides*. The national park «Hutsulshchyna» found only three localities of *Hericium coralloides* – mushroom Red Book of Ukraine. The result of the research was to obtain in a pure culture of the native strain K01. As for the release, and to support and ensure the viability of the fungus in culture potato - glucose agar was the best among the tested environments. Individual features of the growth of *H. coralloides* K01 indicate the narrow trophic features of this strain at cultivation because from five tested media suitable for growth were only two. This strain K01 *H. coralloides* may be considered promising for use as an inoculant respective substrates in the environment, because it is characterized by high rates of radial growth, a short period of log-phase and ability to form stage teleomorphy in pure culture.

Key words: *Hericium coralloides*, pure culture, radial growth rate.

Постановка наукової проблеми та її значення. Охорона рідкісних і зникаючих видів була і залишається однією з основних проблем сьогодення. Стосовно грибів, як і інших груп живих організмів, наявні два основні напрями збереження біорізноманіття – *in situ* та *ex situ* [8]. Перший напрям *in situ* ґрунтується на популяційно-видовому та екосистемному рівні і спрямований на збереження окремих видів грибів та біоценозу їх локалітетів. Однак збереження місць плодоношення

не дає гарантії, що гриби, які там зростають, залишатимуться там постійно. Тому на сьогодні одним із перспективних підходів збереження генофонду рідкісних та зникаючих видів грибів є *ex situ* – введення в штучну культуру та підтримка їх у колекціях живих культур. Не знижуючи практичну значимість кожного з методів, направлених на збереження грибів, назріває нагальна потреба у комплексному застосуванні знань і навичок, отриманих в результаті опрацювання обох напрямів, що стане новим інструментом у природоохоронній справі. Для цього розроблено програму збереження рідкісних видів макроміцетів в НПП «Гуцульщина». Беззаперечним пріоритетним напрямом під час природоохоронної ідеї є створення генофонду рідкісних та зникаючих видів макроміцетів через виділення в культуру різних видів грибів, зокрема їх штамів, виявлених у різних локалітетах. При реалізації завдань відтворювального характеру запорукою успішного та такого, що не суперечить екологічним догмам, культивування рідкісних, зникаючих та вразливих видів грибів є відпрацювання методів по зараженню природних субстратів міцелієм отриманого із аборигенних штамів грибів. Для чого передусім вивчаються ростові показники грибів.

Аналіз досліджень цієї проблеми. Серед рідкісних грибів *Hericium coralloides* – герицій коралоподібний – панголарктичний, реліктовий вид, який характеризується дуже низькою чисельністю в межах ареалу і відмічений у більшості країн Європи. Відзначимо, що всі види роду *Hericium* в Україні трапляються не часто. Слід зауважити, що *H. coralloides*, як *Hericium cirrhatum* та *Hericium erinaceus* рідко реєструються і в Європі. Так, *Hericium erinaceus* є в Червоних списках ряду європейських країн. З іншого боку, він поширений в Японії і Північній Америці і легко культивується для харчового виробництва грибів [7]. Однак нові знахідки *H. coralloides* ретельно фіксуються [9]. У літературі зазначено і про лікувальні властивості грибів р. *Hericium* [10].

Заходи охорони *H. coralloides* в нашій державі регламентовані лише тим, що він включений до переліку видів Червоної книги України, згідно з природоохоронним статусом належить до II категорії «вразливий» [6]. Штами гриба (один з них зібраний в Україні і декілька штамів із США) зазначені в колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного [4].

Метя статті – виділення в чисту культуру аборигенного штаму *Hericium coralloides* K01.

Матеріали і методи дослідження. Міцеліальні культури виділяли із тканини молодих знайдених карпофорів в той же день або на наступний. Для ізолювання тканинної культури відбирали поверхні шипів і частину ніжки плодового тіла. Видаляли рослинні залишки, частинки ґрунту, промивали у стерильній воді і сушили на фільтрувальному папері. Далі плодове тіла поміщали поблизу пальника, розламували. Шматочок тканини із внутрішнього боку, що не дотикався до поверхневих ділянок, стерильним скальпелем переносили в чашку Петрі. Розмір інокуляту 0,8–1,5 см в діаметрі.

При виборі поживних середовищ для дослідження керувалися загальноприйнятими рекомендаціями щодо вибору поживних агаризованих середовищ при культивуванні базидієвих грибів, а також, зважаючи на приналежність цього гриба до групи ксилотрофів, що зумовлюють білу гниль деревини та для побудови гіф використовують лігнін та целюлозу, ми апробували середовища, акцентуючи увагу на максимальному вмісті вуглеводного компоненту. Тому дослідження росту культури гриба проводили на таких агаризованих поживних середовищах: агаризоване пивне сушло, картопляно-глюкозне середовище, середовище Норкранса, Планкетта, Возняковської [2]. Всі середовища готувалися за загальноприйнятими методиками.

Простерилізовану частку гриба із карпофору інокулювали на агар в центр чашки Петрі. Повторність дослідів 5–6-кратна для кожного зразка. Культури інкубувалися при температурі 25–28 °С упродовж 30 діб.

Ріст і морфологію зразків культур, що були пересіяні, вивчали на середовищах зазначеного складу у чашках Петрі, які інкубували при температурі 25–28 °С упродовж 30 діб. Як інокулюм використовували агарові диски ($d = 7$ мм) з міцелієм семидобової культури кожного виду. Згідно з літературними джерелами, міцеліальний ріст дереворуйнівних грибів характеризують різними критеріями: діаметром колонії (у см), щодобовим приростом діаметра колоній (у мм/добу), ростовим коефіцієнтом (у балах), швидкістю радіального росту (мм/добу). Як критерій ми обрали ростовий коефіцієнт та швидкість радіального росту.

Для визначення ростового коефіцієнту кожні 2–3 доби вимірювали діаметр колонії в трьох напрямках, а також висоту колонії (мм). Відмічали щільність колонії за трибальною системою (1 – рідка, 2 – середня, 3 – щільна). На основі отриманих даних вираховували ростовий коефіцієнт (РК) за формулою:

$$PK = dhg/t,$$

де d – діаметр колонії, мм; h – висота колонії, мм; g – щільність колонії; t – вік колонії, доба [2, с. 43].

Кожні 2–3 доби вимірювали радіус колоній у двох взаємно перпендикулярних напрямках для встановлення швидкості радіального росту (V_r , мм/добу) за формулою:

$$V_r = (a - b)/t,$$

де a – радіус колонії наприкінці досліду, мм; b – на початку лінійного росту, мм; t – тривалість лінійного росту, кількість діб. Повторність дослідів – п’яти–шестикратна.

Для верифікації тотожності колоній гриба, отриманих у поверхневій культурі, при кожному пересіві відкладали по одній чашці Петрі, які зберігали в термостаті при зазначених умовах до утворення телеоморфи.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel, використовуючи t -критерій Стьюдента. Вірогідними вважали результати, якщо $P \leq 0,05$.

Виклад основного матеріалу й обґрунтування отриманих результатів дослідження. Досліджуючи мікобіоту НПП «Гуцульщина» (досліджувались макроміцети), виявили 302 види, з них вісім рідкісних і занесених до Червоної книги України [6]: *Anthurus archeri* (Berk.) E. Fischer, *Boletus parasiticus* Fr., *Catathelasma imperiale* (Fr.) Sing., *Clavariadelphus pistillaris* (L.) Donk., *Grifola umbellata* (Fr.) Pilat, *Hericium coralloides* (Fr.) Gray, *Sparassis crispa* (Fr.) Fr., *Strobilomyces floccopus* (Vahl. ex Fr.) P. Karst. Такі види, як *Boletus parasiticus* Fr., *Hericium coralloides* (Fr.) Gray та *Sparassis crispa* (Fr.) Fr. на території парку трапляються дуже рідко (відомі 1–2 локалітети) [5].

За матеріалами маршрутно-експедиційних досліджень станом на 1 січня 2014 р. на території НПП «Гуцульщина» виявлено лише три локалітети *H. coralloides*, всі три місцезростання цього гриба лежать у чистих букових та буково-ялицевих деревостанах на відмерлій деревині бука лісового. Беручи до уваги, що вищезгаданий вид належить до тих компонентів лісових екосистем, які найперше реагують на різну дію несприятливих факторів (особливо антропогенні навантаження: руйнування пнів, дерев з грибницею, очищення лісових площ від пнів та залишків деревини, а також збирання плодівих тіл для споживання в кулінарії, народній та офіційній медицині), стають актуальними дослідження можливості відтворення цього виду в природних умовах через реінюкації. Метою першого етапу відтворення вразливих грибів в НПП «Гуцульщина» є виділення чистої культури *H. coralloides*, плодіві тіла якого виявлені саме на території Парку, а також дослідження впливу складу агаризованих поживних середовищ на швидкість росту міцелію гериція коралоподібного. Особливу увагу на цьому етапі приділяємо розробці відтворюваних методів отримання культури гриба, що дозволило б підтримувати штами в належному фізіологічному стані та запобігти витісненню штамів сторонньою мікрофлорою.

Запровадження в культуру гериція коралоподібного виявилось успішним (рис. 1) при використанні частин базидіом гриба, що був знайдений у заповіднику Каменистий (штам K01).



Рис. 1. Чиста культура *Hericium coralloides*. А – телеоморфа, Б – колонія

Дослідження ростових коефіцієнтів міцелію штаму K01 виявило найвищі показники при культивуванні на картопляно-глюкозному агарі (табл. 1). Дещо з меншим успіхом можна використовувати агаризоване пивне сусло. Середовище Возняковської та Норкранс для культивування майже непридатні.

Таблиця 1

Ростові коефіцієнти колоній *Hericium coralloides* на середовищах різного складу (у балах)

Середовище	Тривалість експерименту, доба											
	3	6	8	10	13	15	17	20	22	25	27	30
Суслоагар <i>n</i> = 6	19,84 ± 2,01	9,59 ± 1,00	6,74 ± 0,58	8,53 ± 0,73	9,15 ± 0,93	8,35 ± 0,84	7,00 ± 0,76	5,95 ± 0,61	5,41 ± 0,55	4,76 ± 0,48	4,41 ± 0,45	3,97 ± 0,4
Планкетта <i>n</i> = 5	35,32 ± 3,73	16,07 ± 1,71	14,14 ± 1,42	12,6 ± 1,38	11,85 ± 1,25	6,17 ± 0,62	4,67 ± 0,48	3,97 ± 0,41	3,60 ± 0,38	3,23 ± 0,33	2,72 ± 0,28	2,45 ± 0,25
Норкранс <i>n</i> = 5	27,78 ± 2,81	25,10 ± 2,62	2,46 ± 0,25	1,96 ± 0,20	1,51 ± 0,11	1,31 ± 0,12	1,15 ± 0,09	0,98 ± 0,07	0,89 ± 0,09	0,79 ± 0,07	0,73 ± 0,06	0,65 ± 0,05
КГА <i>n</i> = 6	25,89 ± 2,38*	23,41 ± 2,42*	22,5 ± 2,30*	21,73 ± 2,18*	17 ± 1,82*	13,18 ± 1,41*	11,95 ± 1,22*	8,93 ± 0,90*	4,06 ± 0,41*	3,57 ± 0,36*	3,31 ± 0,34*	2,98 ± 0,30*
Возняковської <i>n</i> = 5	16,46 ± 1,71	3,77 ± 0,38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Різниця достовірна порівняно з показниками ростових коефіцієнтів міцеліїв, отриманих на середовищах Сусло-агар, Планкетта, Норкранс, Возняковської на відповідну добу експерименту, $P \leq 0,05$.

У живленні вищих базидієвих грибів важливу роль відіграють сполуки, що містять карбон, оскільки забезпечують дві основні функції в метаболізмі цих гетеротрофних організмів: постачають вуглець, необхідний для синтезу речовин живої клітини, та беруть участь у процесах окислення, де є єдиним джерелом енергії [3]. Крім того, сполуки карбону є складовою частиною запасних поживних речовин, необхідних для росту і розвитку міцелію грибів, а також ферментів, що регулюють процеси засвоєння [1, с. 5]. Зважаючи на високі показники ростових коефіцієнтів на картопляно-глюкозному агарі та агаризованому пивному суслі, можна припустити, що позитивний вплив на інтенсивність росту культури *H. coralloides* має варіабельність цукрів у поживному середовищі. Так, бульби картоплі містять в середньому 17,5 % крохмалю, 0,5 % припадає на моно- і полісахариди. У процесі приготування відбувається декстринізація крохмалю, що приводить до значної екструзії поліцукрів з утворенням частинок, які легко переходять у розчинний стан а надалі у відвар. Також картопляно-глюкозний агар містить глюкозу. При культивуванні геріція коралоподібного на монокомпонентних за джерелами вуглецю середовищах (не враховуючи вміст агар-агару – тільки сахароза у середовищі Планкетта, глюкоза у середовищах Возняковської та Норкранс) оптимізації росту міцеліальної культури не виявило. Таким чином, чим різноманітніший набір вуглеводів у поверхневій культурі, тим вищий ростовий коефіцієнт колонії *H. coralloides*, що опосередковано підтверджує здатність вищих базидіоміцетів до деструкції високомолекулярних субстратів і в умовах культури.

Зважаючи на те, що значення ростових коефіцієнтів колонії після інокуляції не перевищували 50, ми віднесли *H. coralloides* до групи повільно ростучих базидієвих грибів.

Аналіз швидкості радіального росту геріція коралоподібного за умов культивування на середовищах різного складу виявив, що міцелій цього гриба, культивованій на картопляно-глюкозному агарі, найшвидше входив у log-фазу – з 3 по 10 добу експерименту, з 10 доби мала місце фаза стаціонарного росту (рис. 2). Тоді як культивування на сусло-агарі та середовищі Планкетта супроводжувалося виражено довшою log-фазою – до 13 доби з меншими показниками швидкості радіального росту.

Скорочення log-фази у процесі культивування поряд із високими показниками радіального росту розглядається як позитивний чинник, а середовище, на якому здійснювалося культивування, – оптимальним та перспективним з погляду подальшого використання міцелію для отримання плодівих тіл.

Таким чином, для цього штаму геріція коралоподібного прослідковувалася тенденція залежності досліджуваних показників від складу поживного середовища. Із апробованих нами середовищ, використання яких мало оптимальний ефект для умов культивування, що проявлялося у вищих ростових коефіцієнтах, швидкості радіального росту та меншому періоді log-фази, найкращим для досліджуваного гриба виявився картопляно-глюкозний агар.

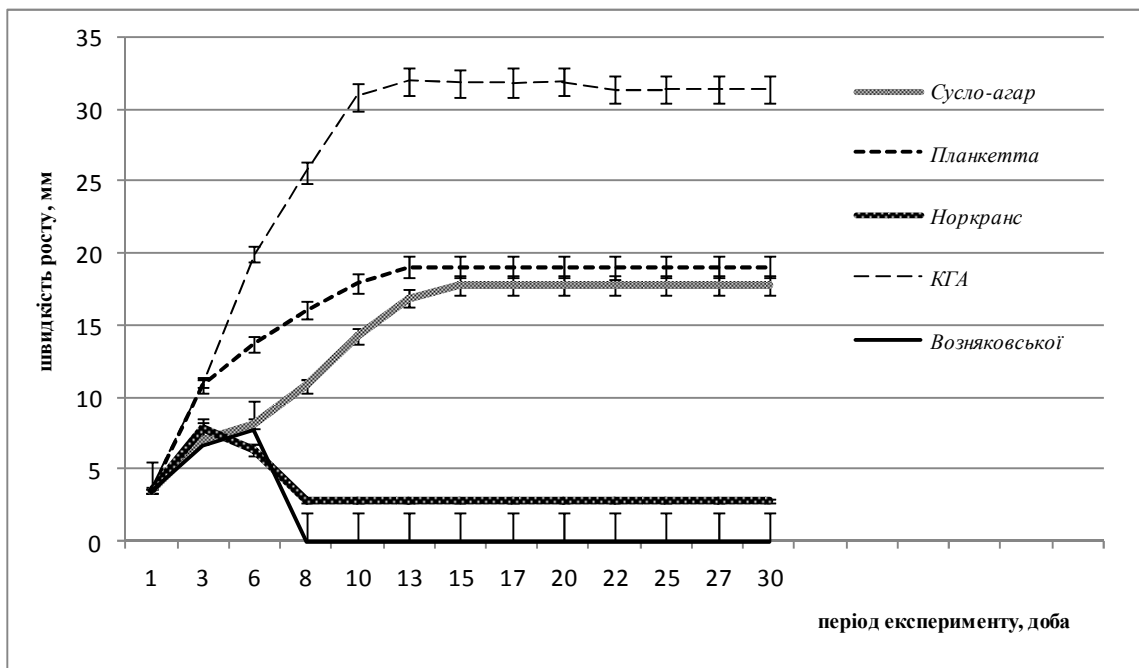


Рис. 2. Швидкість радіального росту *H. coralloides* на середовищах різного складу

Висновки та перспективи подальших досліджень. Результатом проведених досліджень стало виділення в чисту культуру аборигенного штаму *H. coralloides* K01.

Для виділення, підтримки і забезпечення життєздатності *H. coralloides* K01 в культурі картопляно-глюкозний агар виявився оптимальним серед апробованих середовищ.

Індивідуальні особливості росту *H. coralloides* K01 вказують на вузькі трофічні можливості цього штаму при поверхневому культивуванні, оскільки з п'яти апробованих середовищ придатними для росту виявилися лише два.

Виділений в чисту культуру штаму K01 *H. coralloides* ми вважаємо перспективним для використання в процесах інокуляції відповідних субстратів у природному середовищі, оскільки для нього характерні високі показники радіального росту, короткий період лог-фази та утворення в чистій культурі стадії телеоморфи.

Джерела та література

1. Антоненко Л. О. Технологічні особливості глибинного культивування базидіальних грибів роду *Coriolus* / Л. О. Антоненко, І. Р. Клечак // Восточноєвропейский журнал передовых технологий. – 2011. – Т. 54, № 6/6. – С. 2288–2299.
2. Бухало А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А. С. Бухало. – К. : Наук. думка, 1988. – 144 с.
3. Дворнина А. А. Базидиальные съедобные грибы в искусственной культуре / А. А. Дворнина. – Кишинев : Штиинца, 1990. – 112 с.
4. Каталог культур Колекції шапинкових грибів (ІВК) / А. С. Бухало, Н. Ю. Митропольська, О. Б. Михайлова. – К. : Альтерпрес, 2011. – 100 с.
5. Пророчук В. В. Стратегія охорони макроміцетів в Національному природному парку «Гуцульщина» / В. В. Пророчук, С. І. Фокшей // Наук. вісн. НЛТУ України : зб. наук.-тех. пр. – Львів : [б. в.], 2013. – Вип. 23.3. – С. 151–155.
6. Червона книга України. Рослинний світ / за ред. Я. П. Дідуха. – К. : Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
7. Boddy L. Ecology of *Hericiium cirrhatum*, *H. coralloides* and *H. erinaceus* in the UK / L. Boddy, M. E. Crockett, A. M. Ainsworth // Fungal Ecology. – 2011. – Vol. 4, № 2, 3. – P. 163–173.
8. Hawksworth D. L. The numbers of fungi, their significance in ecosystem function, conservation, and importance to man / D. L. Hawksworth // Укр. ботан. журн. – 1991. – Т. 48, № 5. – С. 5–13.
9. Tolpysheva T. Yu. New location of fungus species registered in the red data book of the Tver region / T. Yu. Tolpysheva // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2013. – Vol. 68, Is. 3. – P. 108–109.
10. Wang J. C. Antitumor and immuno-enhancing activities of polysaccharide from culture broth of *Hericiium* spp. Kaohsiung / J. C. Wang, S. H. Hu, C. H. Su, T. M. Lee // J. Med. Sci. – 2001. – № 17. – P. 461.

Стаття надійшла до редколегії
16.10.2013 р.